Aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. med. H.-W. Schlipköter)

Der Einfluss von Blei auf die Immunabwehr gegen Tumorzellen: "IN VITRO-UNTERSUCHUNG MIT DEM LMC-TEST"

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

MANFRED GULAREK

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536502_0041

Aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.med. H.-W. Schlipköter)

DER EINFLUSS VON BLEI AUF DIE IMMUNABWEHR GEGEN TUMORZELLEN:
"IN VITRO-UNTERSUCHUNG MIT DEM LMC-TEST"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

MANFRED GULAREK

1 9 8 1

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Straßburg

Referent
gez.: Prof. Schlipköter

Korreferent
gez.: Prof. Ohnesorge

Die vorliegende Arbeit verdanke ich Herrn Prof. Dr. Schlipköter, Direktor des Instituts für Hygiene der Universität und des Medizinischen Instituts für Lufthygiene und Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf.

Für die unmittelbare Betreuung und beständige Zusammenarbeit bin ich Herrn Dr. Koldovsky besonders dankbar.

Für die Bestimmung der Blutbleispiegel möchte ich mich bei Herrn Dr. Brockhaus und Herrn Dr. Ewers bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Molik, die mir bei der statistischen Auswertung behilflich war, und den Mitarbeitern des Labors für Tumorimmunologie, die bei der Versuchsdurchführung halfen.

Diese Arbeit widme ich meiner Mutter
und meinem Bruder.

INHALTSVERZEICHNIS SEITE

ZUSAMMENFASSUNG (ABSTRACT)..... 1

EINFÜHRUNG..... 2

MATERIAL UND METHODEN..... 9

1. Versuchstiere..... 9
2. Bleibelastung..... 9
3. Blutbleibestimmung..... 9
4. Tumoren.....10
5. Herstellung des Zellmaterials.....10
6. Immunisierung der Versuchstiere.....12
7. Bestimmung der Zellzahl.....13
8. Mikrozytotoxizitätstest
   (LMC-Test).....13
9. Auswertung.....14
10. Versuchsmodell.....14

ERGEBNISSE.....16

I. Allogenes System.....16

II. Syngenes System.....33

DISKUSSION.....50

LITERATUR.....55

Der Einfluß von Blei auf die Immunabwehr gegen Tumorzellen: "In vitro-Untersuchung mit dem LMC-Test"

The influence of lead on the immun defense against tumorcells: "In vitro-experiment with the LMC-test+ "

Abstract

The mice of C57BL/strain - female - were fed for three months with diet containing lead acetate (Altromin 1314, 4000 mg/kg). Within this period the level of lead in blood stabilized at 72 µg lead/100 ml blood.
The immunological activity of the spleen cells was measured by microcytotoxic test in vitro against allogenic and syngeneic tumors. Both nonimmunized mice and immunized mice were tested. The immunocytes from lead treated mice compared with the cells from unexposed control showed significantly higher cell mediated cytotoxicity under all experimental conditions.

Zusammenfassung

Mäuse des Stammes C57BL (weiblich) erhielten über drei Monate bleihaltiges Futter (Altromin 1314, 4000 mg/kg). Nach dieser Anfütterungszeit erreichte der Blutbleispiegel der Tiere einen mittleren Wert von 72 µg Blei pro 100 ml Blut.
Die immunologische Aktivität der Milzzellen gegen allogene und syngene Tumoren wurde im Mikrozytotoxizitätstest bestimmt.
Wir untersuchten nichtimmunisierte und immunisierte Tiere. Die Immunzellen bleibelasteter Mäuse zeigten

---

+LMC-Test = (engl.) lymphocyte microcytotoxic test

gegenüber den Zellen nichtexponierter Kontrolltiere signifikant höhere zellvermittelte Immunität unter allen Versuchsbedingungen.

Einführung

Das Immunsystem ist an der Abwehr äußerer Einflüsse (z.B. Infektionen) oder innerer Abläufe pharmakologischer oder toxikologischer Art und auch an den Auswirkungen von Umweltbelastungen unmittelbar beteiligt (30, 41).
Der Tumor kann im weiteren Sinne als "Parasit" angesehen werden. Das Immunsystem ist in der Lage, bösartig transformierte Zellen zu entfernen. Tiere mit angeborenen T-Zelldefekten oder thymektomierte Tiere zeigen, da bei ihnen eine Unterdrückung der zellbedingten Immunreaktion vorliegt, ein beschleunigtes Tumorwachstum (2).

Langanhaltende Immunsuppression durch Zytostatika, Corticosteroide oder andere Immunsuppressiva können das Wachstum fördern; eine nichtspezifische Stimulation der Immunität bewirkt eine Abnahme der Tumorhäufigkeit und eine verlängerte Überlebenszeit des tumortragenden Tieres (30).

Für eine wirksame Tumorabwehr müssen die Kräfte des Immunsystems in einem "gesunden" Gleichgewicht bleiben. Dieses Gleichgewicht wird durch die Regulation und das Zusammenwirken der verschiedenen Populationen der Immunozyten gesichert: T-Zellen und ihre Subpopulationen, B-Zellen, NK-Zellen (= natural killing cells) und Makrophagen.
Die Kooperation verläuft nicht nur durch direkten Zellkontakt, sondern auch durch Zellprodukte

(z.B. Antikörper, Lymphokine).
Schon geringe Störungen der Funktion einer Zellpopulation können bedeutsame Wirkungen zeigen. Deshalb ist es erforderlich, zu prüfen, ob Umweltschadstoffe, die in niedrigen Dosen keine unmittelbar nachweisbaren biologischen Veränderungen in dem betroffenen Organismus hervorrufen, Einflüsse auf das Immunsystem ausüben.
Zu den zahlreichen Schadstoffen in unserer Umwelt gehören Bleiverbindungen, die durch Kraftfahrzeugabgase und die bleiverarbeitende Industrie emittiert werden.
Auch in der Arbeitsmedizin spielen Bleiintoxikationen eine nicht zu unterschätzende Rolle, da die Arbeitnehmer durch anorganisches Blei beim Verladen von Bleierzen und deren weitere Verarbeitungsprozesse gefährdet sind. 1180 Erkrankungen durch Blei oder seine Verbindungen wurden nach der Berufskrankheiten-Verordnung in den Jahren 1952 bis 1965 erstmals entschädigt. Im Zeitraum von 1966 bis 1975 waren nur 210 Personen betroffen. Die deutliche Abnahme der Morbidität ist zum Teil auf verbesserte Technologien in der Bleiverarbeitung und auf den gezielten Einsatz prophylaktischer Maßnahmen, wie früh- und feindiagnostische Untersuchungsmethoden, zurückzuführen (43).

Die Bleivergiftung ist wahrscheinlich eine der ältesten Berufserkrankungen; denken wir beispielsweise an den Bleinachweis in den glasierten Ziegeln des Turmes von Birs-Nimrud im Euphrat/Tigris (7). Schon HIPPOKRATES schrieb über Krankheitserscheinungen in Bleiminen und PARACELSUS berichtete über Blei in seiner Abhandlung über berufliche Erkran-

kungen. Bereits im 15.Jahrhundert empfahl ELLENBORG vorbeugende Maßnahmen gegen die berufliche Vergiftung durch Blei und Quecksilber (11). Seitdem ist durch umfangreiche toxikologische und arbeitsmedizinische Erfahrungen der Wissensstand über Aufnahme, Ausscheidung, Speicherung des Bleies sowie seine Wirkung auf einzelne Organe und Organsysteme ständig angewachsen.

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist die mögliche Belastung des Immunsystems durch Blei. Diese Fragestellung ist mehrfach untersucht worden:
In den bisherigen Experimenten mit Blei- oder anderen Schwermetallexpositionen konnte meist eine Hemmung der Immunität festgestellt werden.

Bereits 1973 berichtete KOLLER (31) über verminderte Antikörpertiter bei Kaninchen, die 70 Tage lang bleiacetathaltiges Trinkwasser bekamen. Ein Jahr später bestätigten KOLLER und KOVACIC (32) dieses Ergebnis an Mäusen (Swiss Webster). Sie belasteten die Versuchstiere durch bleiacetathaltiges Trinkwasser mit drei verschiedenen Bleikonzentrationen (1375 ppm., 137,5 ppm., 13,75 ppm.) über 56 Tage. Nach einmaliger intraperitonealer Applikation von Schaferythrozyten (SRBC) (Primärantwort)und nach einer zweiten Injektion nach sieben und vierzehn Tagen (Sekundärantwort) konnte bei allen drei Konzentrationen eine signifikant verminderte Antikörperproduktion nachgewiesen werden.
Bei akuter Einwirkung einer einmaligen Applikation von 4 mg Blei zeigte sich bei Swiss Webster-Mäusen nach intraperitonealer Verabreichung von Schaferythrozyten als Antigen eine hochsignifikante Immunglobulin (Ig)-M-Antikörper-Erhöhung (KOLLER et al (33)). Zu einem zeitlich verzögerten Anstieg

4 mg Blei intraperitoneal verabreicht wurde. Die Sekundärantwort auf Schaferythrozyten war bei allen bleibelasteten - oral und intraperitoneal - Mäusen hochsignifikant reduziert.

Nur selten wurde über eine erhöhte Immunantwort bei Tieren berichtet.

Signifikant erhöhte Antikörpertiter wiesen SCHLIPKÖTER et al (1976)(35) bei NMRI-Mäusen nach, die mit Rinder-Gamma-Globulin oder Human-Serum-Albumin nach achtwöchiger intraperitonealer Verabreichung von Blei immunisiert wurden.

Deutliche Erhöhungen der Phagozytoseaktivität von Peritonealmakrophagen konnten KOLLER und ROAN (1977)(34) bei Mäusen nachweisen, die 70 Tage bleiacetathaltiges Trinkwasser mit drei verschiedenen Konzentrationen (13, 130 und 1300 ppm.) erhalten hatten.

Die genannten Ergebnisse lassen vermuten, daß der Einfluß des Schwermetalls auf die Antikörperbildung auch von der Applikationsart abhängig sein kann.

Mehrere Untersuchungen liegen über den Einfluß von Blei auf Makrophagen vor:

BINGHAM et al (1968)(5) berichteten, daß Ratten, die bis zu einem Jahr 10 µg oder 150 µg Blei-Sesquioxid (Pb_2O_3)/m^3 Atemluft inhaliert hatten, eine hochsignifikante Verminderung der Alveolarmakrophagen der bleibelasteten Tiere gegenüber einer Kontrollgruppe zeigten. Auch eine kurzzeitige Bleiexposition von 150 µg/m^3 Luft führte bereits nach einem Zeitraum von weniger als einer Woche zu einer maximalen Reduktion der Alveolarmakrophagen.

BECK und MANOJLOVIC (1972)(4) stellten in vitro an Meerschweinchenmakrophagen eine Schädigung der Alveolarmakrophagen nach Inkubation von 3 µg organischer Bleiverbindungen/10^6 Zellen fest.

KAMINSKI et al (1977)(27) berichteten über signifikant verminderte Überlebenszeiten der Alveolarmakrophagen, die von Long-Evans-Inzuchtratten nach einmaliger intrapulmonaler Gabe von 0,25 mg oder 1,0 mg Bleioxid gewonnen wurden.

Eine einmalige Injektion von Bleiacetat verursachte bei Ratten und Mäusen eine verminderte Fremdstoffelimination aus dem Blut (42).
TREJO et al (1972)(42) führen diesen Effekt auf eine verminderte Phagozytoseaktivität der Lebermakrophagen zurück. Diese bleibedingte Makrophagenschädigungen, aber auch möglicherweise Störungen des Immunsystems sind die Ursachen für die Beobachtung, daß die Resistenz bleibelasteter Versuchstiere gegenüber Infektionen vermindert war (1, 17, 25, 41).
Die Ergebnisse zeigen, daß die Wirkung von Schwermetallen auf das Immunsystem, insbesondere auf die Antikörperbildung und die Funktion der Makrophagen uneinheitlich sind.

Wenn die Tumorentwicklung einer immunologischen Kontrolle unterliegt und das Immunsystem durch erhöhte Bleispiegel im Organismus beeinflußt wird, stellt sich die Frage, ob dieses Schwermetall die Ausbildung oder Entwicklung von Tumoren beeinflussen kann.

1972 beobachteten BRUCH, BROCKHAUS und DEHNEN(10), daß die Fähigkeit der Alveolarmakrophagen von bleibelasteten Ratten, Benzo(a)pyren abzubauen durch Depression der Benzo(a)pyren-Hydroxylase-Aktivität

vermindert war. Diese bleibedingte Veränderung des Benzo(a)pyren-Metabolismus ist zwar unabhängig von Immunreaktionen, sie kann jedoch die chemische Kanzerogenese beeinflussen.

KOBAYASHI und OKAMATO (1974)(28b) berichteten über kokarzinogene Effekte von Bleioxid bei Syrischen Hamstern, denen Benzo(a)pyren und Bleioxid in die Lungen instilliert wurden. Sie entwickelten mehr atypische Epithelproliferationen, Adenome und Adenokarzinome als Hamster, die nur Benzo(a)pyren oder nur Bleioxid erhalten hatten.

STONER et al (1976)(39) zeigten, daß bei Mäusen des A-Stammes, denen intraperitoneal eine sehr hohe Dosis von 150 mg Blei-Subacetat/kg Körpergewicht appliziert wurde, signifikant mehr Lungentumoren auftraten als bei den nicht bleiexponierten Tieren.

Auch die Wirkung von Cadmium auf die Tumorentwicklung wird in einer neueren Arbeit von KERKVLIET, KOLLER et al (1979) (28a) untersucht. Eine chronische Belastung mit hohen Cadmiumdosen (300 ppm. im Trinkwasser) bei Mäusen hemmten das Tumorwachstum. Die Autoren erklären dieses Ergebnis mit einer Verminderung der zellvermittelten Immunität.

Ob die Tumorentwicklung und die Kanzerogenese immunologisch beeinflußt werden, ist noch nicht endgültig geklärt, auch gibt es keine eindeutigen Hinweise auf die Wirkung einer Bleibelastung auf die Entstehung und Entwicklung von Tumoren. Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zu diesen noch offenen Fragen liefern. Die Untersuchungen wurden parallel zu Experimenten von WILLE et al (1981)(44) durchgeführt, die neun Ta-

ge nach intravenöser Injektion syngener Tumorzellen bei chronisch bleibelasteten Mäusen weniger Lungenmetastasen als bei den Kontrolltieren beobachteten. Um die Ursache für die Hemmung der Metastasenbildung zu untersuchen, sollte in der vorliegenden Arbeit die Aktivität der Immunzellen von bleibelasteten Mäusen und Kontrolltieren in vitro gemessen werden. Hierzu verwendeten wir den Mikrozytotoxizitätstest, bei dem Tumorzellen und Immunzellen der Milz inkubiert werden. Den Einfluß von Blei auf die zytotoxische Aktivität der Immunzellen bestimmten wir im allogenen (C57BL/6, anti-A) und im syngenen System (C57BL/6) an immunisierten und nichtimmunisierten Tieren.

Material und Methoden

1. Versuchstiere

Für die Experimente verwendeten wir zweihundert weibliche, 10-12 Wochen alte C57BL/6-Inzuchtmäuse aus der Zucht des Zentralinstituts für Versuchstiere, Hannover.
Alle Tiere befanden sich in einem von Neonröhren künstlich beleuchteten Raum, der akustisch gegenüber der Außenwelt weitgehend abgeschirmt war. Um den Tag-Nacht-Rhythmus zu simulieren und konstant zu halten, wurde die Beleuchtung automatisch um 9 Uhr morgens ein- und abends um 21 Uhr ausgeschaltet. Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur ($22\pm2^{\circ}C$) und Luftfeuchtigkeit (30-40%) in Makrolonkäfigen gehalten. In jedem Käfig waren zehn Tiere untergebracht, und es wurde Wasser ad libitum gegeben.

2. Bleibelastung

Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen unterteilt:
Gruppe A diente als Kontrollgruppe (100 Tiere). Diese Mäuse erhielten normales Futter (Altromin 1314) ohne Bleizugabe.
Die bleibelasteten Tiere (Gruppe B) bekamen Altrominfutter mit einem Bleizusatz von 4000 mg Bleiacetat pro Kilogramm Futter.

3. Blutbleibestimmung

Als geeigneter biologischer Indikator der aktuellen Bleibelastung des Organismus gilt der Blutbleigehalt. Die Blutbleispiegel wurden durch das flammenlose Atomabsorptionsverfahren (11) ermittelt. Zur Analyse wurden Blutproben von drei bis vier Versuchstieren gepoolt. Die belasteten

Versuchstiere hatten einen mittleren Blutbleispiegel von 72 µg/100 ml Blut; die Werte der Kontrolltiere lagen in allen Fällen unter 2 µg Blei/100 ml Blut.[+)]

4. Tumoren

Wir verwendeten zwei Tumorarten:

a) den LEWIS-Tumor, der ein methylcholanthreninduzierter Lungentumor und stammspezifisch für C57BL/6-Mäuse ist (20).[++)]

b) den YAC-Tumor, der ein Lymphom ist und durch Moloney-Leukämie-Virus in neugeborenen A/JAX-Mäusen hervorgerufen wurde. Wir haben die ascitische Form benutzt (FENYÖ et al (12, 13, 14, 15))[++)].

5. Herstellung des Zellmaterials

a) LEWIS-TUMORZELLEN

Das tumortragende Tier wurde durch Brechen der Halswirbelsäule getötet und anschließend gespült. Nach Abtragen der Haut konnte das Tumormaterial herausgeschält und von nekrotischen Teilen befreit werden. In einer Petrischale zerkleinerten wir mit einer Schere das Tumorgewebe. Um die Zellaggregate zu lösen, wurde das Tumormaterial in einen Erlenmeyerkolben zehn Minuten bei 37°C unter Zusatz in einer 2,5%igen Trypsinlösung gerührt. Nach Absetzen wurde der erste Überstand dieser Suspension verworfen, da er tote Zellen enthielt. Das restliche Material wurde dreifach trypsiniert und durch sterile Gaze filtriert. Um die Wirkung des Trypsins aufzu-

---

+) Für die freundliche Unterstützung danken wir Herrn Dr. Brockhaus und Herrn Dr. Ewers.

++) Für die Überlassung des Tumormaterials danken wir Herrn Prof. Dr. Eichmann vom Krebsforschungs-

heben, gaben wir dem Filtrat anschließend Minimal Essential Medium (MEM) mit 10%igem fetalen Kalbserum, Glutamin und Antibiotika (FLOW LABORATORIES) hinzu. Nach zehnminütigem Zentrifugieren und Absaugen der Überstände resuspendierten wir das Sediment mit 5 ml Medium (MEM), gaben es in Falcon-Plastikhalterflaschen (Falcon 25 cm^2, 50 ml) und inkubierten das Material bei 37°C mit 5% Kohlendioxid.

b) YAC-TUMORZELLEN

Nach Tötung der Maus wurde der YAC-Tumor aus der Peritonealhöhle mit einer Einmalspritze abpunktiert. Das gewonnene Material gaben wir in Wachstumsmedium (MEM) und zentrifugierten das Punktat zehn Minuten. Die Überstände wurden verworfen, das Sediment mit Medium (MEM) resuspendiert und in Kulturflaschen (Falcon 25 cm^2, 50 ml) bei 37°C mit 5% Kohlendioxid inkubiert.

c) IMMUNZELLEN

Die Immunozyten wurden aus den Milzen der Versuchs- bzw. Kontrolltiere gewonnen. Wir entnahmen retroperitoneal die Milzen von vier Tieren. Die Organe gaben wir in eine mit Medium (MEM) beschickte Petrischale, um die Milzen vom Erythrozytenüberschuß freizuwaschen. Dazu wurde eine 5 ml-Einmalspritze mit Medium (MEM) aufgezogen und mit feiner Nadel (Nr. 20) solange in jedes Organ gespritzt, bis die rote Farbe der Milzen auffallend heller wurde. Danach wurden die Organe in eine mit Medium (MEM) gefüllte Petrischale gelegt und mit zwei Kanülen (Nr. 2) zerkleinert. Die größeren Gewebestückchen filtrierten wir durch Gaze ab. Das Filtrat wurde zehn Minuten zentrifugiert und danach die Überstände dekantiert.

Das Sediment wuschen wir zweimal mit sterilem PBS (phosphat buffer saline, pH: 7,2) und resuspendierten die sedimentierten Zellen mit Medium (MEM).

6. Immunisierung der Versuchstiere

Zur Immunisierung der Versuchstiere applizierten wir zellfreie Tumorextrakte.
Hierzu wurden die Zellen des YAC-Tumors zuerst mit PBS zweimal gewaschen, dann in PBS resuspendiert (20% Volumen-Suspension) und dreißig Sekunden mit Ultraschall behandelt (Apparat der Firma Bandelyn, Modell SONAREX RK 102). Danach wurde die Suspension zwanzig Minuten bei 4000 Upm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert, der zellfreie Überstand in kleine Volumen (3 ml) eingeteilt und anschließend bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt.
Das Medium der Gewebekulturen mit LEWIS-Tumorzellen wurde abgesaugt, 5 ml Trypsin hinzugegeben und die Kulturflasche leicht geschwenkt. Anschließend saugten wir 4,8 ml Trypsin ab und gaben die Kulturflasche für zehn Minuten in den Inkubator bei 37°C. Danach wurde PBS hinzugegeben, die Zellen zweimal gewaschen, in PBS resuspendiert (20% Volumen-Suspension) und dreißig Sekunden mit Ultraschall behandelt. Anschließend zentrifugierten wir das Material bei 4000 Upm für zwanzig Minuten und froren den zellfreien Überstand ein, um jede Immunisierung mit dem selben Extrakt durchführen zu können.
Zur Immunisierung wurde den Versuchstieren einmal 0,5 ml zellfreies Material intraperitoneal appliziert. Die Milzen dieser Tiere wurden in bestimmten Intervallen nach der Immunisierung (s. Abb. 1) entnommen.

7. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden geeignete Kulturflaschen, die mikroskopisch eine ausreichend hohe Zahl von Zellen zeigten und frei von Verklumpungen waren, ausgewählt. Nach Dekantierung wurden die Zellen mit Trypsin versetzt und zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Danach gaben wir 10 ml Medium (MEM) hinzu.
Da zur Durchführung des LMC-Tests die Suspensionen 80% oder mehr Lebendzellen enthalten müssen, wurde die Zahl der toten Zellen durch Zugabe von 0,5% Trypanblue-Farbstoff bestimmt. Die Auszählung der angefärbten, also abgestorbenen Zellen erfolgte in der Neubauer-Zählkammer.

8. Mikrozytotoxizität-(LMC)-Test

Den LMC-Test führten wir nach der Methode von TAGASUGI und KLEIN (23, 24, 40) durch.
Die Tumorzielzellen wurden in Wachstumsmedium (MEM) in einer Konzentration von 6×10^3 Zellen pro ml vorbereitet und pro Vertiefung der Falcon-Mikrotestplatte Nr. 3040 0,1 ml eingesetzt. Da nur etwa 10-20% der angesetzten Zellen anwächst, erhielten wir auf diese Weise 100-200 Zellen im Kontrollansatz. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation bei 37°C in 5% Kohlendioxid-Atmosphäre wurden den Tumorzellen Immunzellen in verschiedenen Verdünnungsverhältnissen zugegeben (500 Immunzellen:1 Tumorzelle, 250:1, 125:1, 60:1, 30:1...bis 3:1; Verdünnungsfaktor 2). Nach viertägiger Inkubation des Reaktionsgemisches wurden die Mikroplatten mit PBS gewaschen, mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Farblösung gefärbt.
Wir führten diesen Test mit den bestimmten Verdünnungsreihen jeweils sechsmal durch.

9. Auswertung

Zur Feststellung der Zytotoxizität wurden die intakten Tumorzellen mikroskopisch ausgewertet, wobei die angefärbten und intakten Tumorzellen ausgezählt wurden. Die Zellen können durch ihre Form von den Immunozyten unterschieden werden. Bei der Auswertung verglichen wir die Anzahl intakter Tumorzellen, die mit Immunzellen aus bleibelasteten Mäusen inkubiert waren, mit der Zahl von Tumorzellen, die mit Immunozyten der Kontrolltiere inkubiert waren. Die Zellzahl der jeweiligen Mikroplatten ohne Immunzellen (Kontrollansätze) wurden einer Wachstumsrate von 100% gleichgesetzt bzw. einer Reduktion des Tumorwachstums von 0%. Der Einfluß der Immunzellen wurde dann in Prozentwerten der Reduktion der Tumorzellen ausgedrückt.

10. Versuchsmodell

Der Durchführungsplan der Experimente ist in Abbildung 1 wiedergegeben:

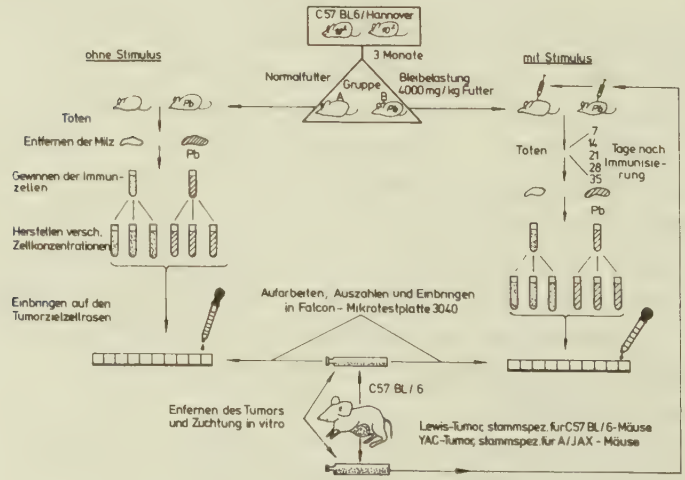


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsplanes

Die Versuche unterteilten sich in zwei Gruppen:

1. Experimente mit nichtimmunisierten Tieren
2. Versuche mit Mäusen nach einmaliger intraperitonealer Injektion eines zellfreien Extraktes, der aus Tumormaterial gewonnen wurde.

Pro Versuchsansatz mußten je vier Tiere der bleibelasteten Gruppe und der Kontrollgruppe getötet werden.
Im allogenen System wurden Experimente zweimal sowohl ohne Immunisierung als auch sieben Tage nach einmaliger Immunisierung durchgeführt (je 16 Tiere von Gruppe A und B).
Im syngenen System führten wir einen Versuch mit nichtimmunisierten Tieren und die restlichen Experimente 7, 14, 21, 28 und 35 Tage nach einmaliger intraperitonealer Immunisierung durch (je 24 Tiere pro Gruppe).
Für die Hauptversuche wurden insgesamt 80 Mäuse, für die Vorversuche 32 bleiexponierte und 44 Kontrolltiere verwendet.

Ergebnisse

I. Allogenes System

A. Meßwerte

In nachfolgenden Tabellen (Tabelle 1 und Tabelle 2) sind die ausgezählten vitalen YAC-Tumorzellen nach Auswertung des LMC-Test angegeben:
- Experimente mit nichtimmunisierten Tieren

Tabelle 1a: Ausgezählte vitale Tumorzellen, die mit mit Immunozyten von Milzen aus bleibelasteten Versuchstieren in verschiedenen Verhältnissen inkubiert waren

Verhältnisse Immunzellen:Tumorzellen							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
27	40	46	51	67	81	89	87
38	56	50	55	81	92	96	101
29	42	52	62	73	73	95	94
40	48	58	64	65	95	92	100
15	50	49	41	70	85	96	90
29	40	40	68	65	76	105	85

Tabelle 1b: Ausgezählte vitale Tumorzellen, die mit Immunozyten von Milzen aus bleifrei ernährten Mäusen in verschiedenen Verhältnissen inkubiert waren.

Verhältnisse Immunzellen:Tumorzellen							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
35	65	95	98	101	92	101	102
42	79	91	100	100	105	96	85
40	66	92	115	120	93	100	96
31	70	109	103	103	106	85	100
28	65	115	100	85	107	108	92
38	65	85	96	105	85	93	83

- Experimente mit intraperitoneal immunisierten Tiere (7 Tage nach Immunisierung)

Tabelle 2a: Ausgezählte vitale Tumorzellen, die mit Immunozyten von Milzen aus bleibelasteten Versuchstieren in verschiedenen Verhältnissen inkubiert waren.

Verhältnisse Immunzellen:Tumorzellen							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
12	14	21	29	47	78	97	99
17	9	30	21	34	64	100	102
6	21	39	17	29	57	82	109
4	8	18	24	38	49	71	81
19	4	24	36	51	61	89	89
34	7	29	17	30	60	68	96

Tabelle 2b: Ausgezählte vitale Tumorzellen, die mit Immunozyten von Milzen aus bleifreigefütterten Mäusen in verschiedenen Verhältnissen inkubiert waren

Verhältnisse Immunzellen:Tumorzellen							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
41	34	48	51	67	92	102	97
32	21	69	39	72	77	91	117
20	12	83	30	48	89	100	89
28	43	94	25	56	93	83	98
17	29	78	37	59	84	112	77
28	39	74	56	31	88	118	116

B) Globale Analyse des Testsystems

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse wurden drei im Versuchssystem getestete Einflußgrößen statistisch geprüft:

-Immunzellzugabe: 8 Konzentrationsstufen für Immunzellen je Tumorzelle (500:1, 250:1, 125:1...6:1)

-Bleizugabe: 2 Stufen (ohne Bleibelastung, 4000 mg Bleiacetat pro kg Futter)

-Untersuchungstag: bzw. Entnahmezeitpunkt der Milzen: 2 Stufen (Sofortige Entnahme bei Experimenten ohne Immunisierung, Entnahme sieben Tage nach Immunisierung)

Diese drei Größen wurden untersucht auf:

A. Signifikanz der Effekte (Haupteffekte) und deren Wechselwirkungen

B, Rangfolge der Effekte

C. Abschätzung der Effekte als Abweichungen vom Gesamtmittel für die jeweiligen Stufen der Einflußgrößen

Hierzu wurden ausgewählte varianzanalytische Ansätze geprüft. Die linearen Modelle erklären insgesamt rund 80% der Varianz.
Wir kamen zu folgenden Ergebnissen:

Die Haupteffekte der drei Einflußgrößen sowie deren Wechselwirkungen sind bis auf die Wechselwirkung Bleizugabe und Untersuchungstag signifikant (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Dreifaktorielle Varianzanalyse

Variationsursache	Summenquadrate	FG[+)]	Prüfgröße F	I.W.
Haupteffekte:				
V1 = Immunzellzugabe	104764,04	7	160	0,00
V2 = Bleizugabe	20028,75	1	214	0,00
V3 = Untersuchungstag	22511,67	2	240	0,00
2-fache Wechselwirkungen:				
V1, V2	8695,95	7	13	0,00
V1, V3	13666,04	7	20	0,00
V2, V3	29,29	1	0,3	0,57
3-fache Wechselwirkung:				
V1, V2, V3	1934,25	7	3	0,00
Erklärte Varianz	171629,99	32	59	0,00
Restvarianz	14968,51	160		
Gesamtvarianz	186598,50			

Die Rangfolge der Effekte ergab sich aus den eta-Werten[++)] (Tabelle 4) sowie den F-Werten unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade.
Den stärksten Einfluß auf die Meßergebnisse hat die Immunzellzugabe (eta= 0,75), während die Bleiexposition (eta= 0,33) und der Untersuchungstag (eta= 0,35) etwa gleiche Effekte ausüben.

[+)] FG = Freiheitsgrade
I.W.= Irrtumswahrscheinlichkeit

[++)] Anteil eines Faktors an der Erklärung der Gesamtvarianz

Die für die jeweiligen Faktorstufen geschätzten Effekte auf das Gesamtmittel (Tabelle 4) untersuchten wir auf Monotonie oder einen systematischen Trend.
Es ist jedoch zu beachten, daß bei signifikanten Wechselwirkungen zwischen Faktoren die Interpretation der Haupteffekte nur bedingt gültig ist, da die Haupteffekte für jede Faktorkombination abweichend auftreten. Da aber die Prüfgröße F für Wechselwirkungen eine Größenordnung kleiner ist als für die Hauptwirkungen, kann trotzdem eine bedingt gültige Aussage aus den geschätzten Haupteffekten gewonnen werden.
Aus den Werten von Tabelle 4 läßt sich ablesen, daß das Verhältnis Immunzellen:Tumorzellen von 60:1 einen stärkeren Effekt zeigt als die Ratio 125:1. Eine Zunahme der Hemmung des Tumorwachstums ist, obwohl nicht streng monoton und linear ausgeprägt, sichtbar; erst ab einer Ratio von 30:1 ist ein deutlicher Effekt feststellbar.
Die Unterschiede, die sich z.B. zwischen den Stufen der Immun-/Tumorzellrationes 250:1 und 125:1 ($\Delta x_1 = 23{,}4$)[+)] ergeben, liegen in der gleichen Größenordnung wie die Effekte, die sich durch die Kombination Bleizugabe/bleifreie Erklärung ($\Delta x_2 = 20{,}3$) bzw. sofortige Milzentnahme (Experimente ohne Immunisierung)/Milzentnahme sieben Tage nach Immunisierung ($\Delta x_3 = 21{,}6$) ergeben. Auch hier sind die Effekte durch Blei und Untersuchungstag annähernd gleich.

+) x_i = Differenz zwischen den geschätzten Effekten der genannten Faktorstufen

Tabelle 4: Abschätzung der Effekte als Abweichungen vom Gesamtmittel für die jeweiligen Stufen der Einflußgrößen

a) mit unlogarithmierten Daten
b) mit logarithmierten Werten

Gesamtmittel: a) 65,3

b) $10^{1,74} = 54,95$

VARIABLE:	Ratio	Geschätzte Effekte auf das Gesamtmittel (a)		(b)
Immunzellzugabe:	500:1	-38,2		-30,96
	250:1	-26,63	$x_1=23,4$	-25,44
	125:1	- 3,21		0
	60:1	-10,09		- 8,18
	30:1	1,04		6,71
	15:1	17,29		26,35
	6:1	29,8		40,56
	KONTROLLE	30		40,56
		Eta: 0,75		Eta: 0,70
Bleizugabe:				
1 Ohne Bleigabe		10,2	$x_2=20,4$	-12,67
2 Mit Bleizugabe		-10,2		
		Eta: 0,33		Eta: 0,31
Untersuchungstag:				
1 Ohne Immunisierung		10,8	$x_3=21,6$	15,85
2 7 Tage nach Immunisierung		-10,8		-12,3
		Eta: 0,35		Eta: 0,37

Unter der Annahme, die Verteilungseigenschaften der Zellen des Versuchsplanes zu verbessern, wurde die Abschätzung der Effekte als Abweichungen vom Gesamtmittel

für die jeweiligen Stufen der Einflußgrößen mit logarithmierten Daten durchgeführt. Durch die Logarithmierung der Werte können Asymmetrien abgeschwächt werden.
Wir können feststellen, daß sich keine wesentlichen Unterschiede gegenüber der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit unlogarithmierten Daten ergeben.

Abschließend wurde eine Regressionsanalyse der Einflußgrößen durchgeführt. Hierbei wurden diese Werte als metrische Variablen behandelt, d.h. es wird eine Rangordnung und ein Abstand zwischen den Stufen der Einflußgrößen angenommen.
Die Regressionsanalyse (Tabelle 5) ergab, daß eine signifikante negative Korrelation sämtlicher Einflußgrößen auf die Zahl der Tumorzellen des Testsystems besteht. Die stärkste Korrelation zeigt die Immunzellzugabe. Je mehr Immunzellen zugegeben wurden, umso stärker wurde das Wachstum der Tumorzellen gehemmt.
Die qualitativen Resultate sind mit den Ergebnissen der Varianzanalyse gut vergleichbar (Rangordnung der Haupteffekte),weil die Variablen Bleizugabe und Untersuchungstag nur zwei Ausprägungen haben.
Aus der Varianzanalyse wird durch die Abschätzung der Effekte deutlich, daß die Wirkungen einen angenähert linearen Trend zeigen.
Unter Einsetzen einer Konstante (b_0 = 101,62), unstandardisierten Regressionskoeffizienten (b_1, b_2, b_3) für die untersuchten drei Einflußgrößen und angenommener Werte für die Einflußvariablen (x_1, x_2, x_3) läßt sich eine Regressionsgleichung aufstellen und Schätzwerte für die Zahl zu erwartender Tumorzellen bestimmen:

$y_o = f(x_1, x_2, x_3)$

$= b_o + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3$

Zum Beispiel ergibt sich für:

$x_1 = 500$ (Immunzellen)

$x_2 = 4000$ (Bleiacetat in mg)

$x_3 = 7$ (Tage nach Immunisierung)

folgende Schätzung der Zahl von Tumorzellen:

$y_o = 101{,}62 - 0{,}12 \cdot 500 - 0{,}005 \cdot 4000 - 3{,}09 \cdot 7$

$y_o = 0{,}34$

========

Für die angenommenen Versuchsbedingungen wird eine Reduktion des Tumorzellwachstums von nahezu 100% geschätzt.

Nach der Beurteilung der Einflußgrößen am gesamten Testsystem wurden einzelne Mittelwertsvergleiche mit dem Student's-t-Test durchgeführt.

Tabelle 5: Multiple Regression der Einflußgrößen auf die Tumorzahl des Testsystems

a) Unlogarithmierte Daten
b) Logarithmierte Werte

Einflußgröße	Einfacher Korrelationskoeffizient r		Multipler K.+ R		standardisierter Regressionsk. beta		unstand. R.++ (unlog.)
	a	b	a	b	a	b	
x_1: Immunzellzugabe	-0,65	-0,64	0,65	0,64	-0,65	-0,64	-0,12
x_2: Bleizugabe	-0,33	-0,31	0,81	0,80	-0,33	-0,31	-3,09
x_3: Untersuchungstag	-0,35	-0,37	0,74	0,74	-0,35	-0,37	-0,005

Konstante:
b_o = 101,62

+Korrelationskoeffizient

++Regressionskoeffizient

C) Einzelvergleiche zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen Faktorkombinationen

Experimente ohne Immunisierung

Tabelle 6 zeigt, daß durch die definierte Bleizugabe der Unterschied zum Kontrollansatz (= Tumorzellen ohne Immunozyten) im Gegensatz zu dem Experiment ohne Bleieinfluß verstärkt wird:
Bereits ab einer Zellratio von 30:1 wird der Unterschied signifikant, während bei dem Versuch ohne Bleizugabe erst bei einem Zellverhältnis von 250:1 signifikante zytotoxische Effekte im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden können.

In Tabelle 7 sollen die Unterschiede im Tumorzellwachstum zwischen den Versuchen mit bleigefütterten und bleifreiernährten Tieren bei allen untersuchten Immunzell-/Tumorzellverhältnissen dargestellt werden. Diese Effekte (= Zytotoxizität) fallen auf den einzelnen Stufen verschieden stark aus. Die größten Differenzen zeigen die mittleren Verhältnissen (125:1, 60:1). Bei einer Ratio von 500:1 ist keine Signifikanz feststellbar, da die hohe Dosis eingesetzter Immunozyten in jedem Fall massiv gewirkt hat.
Gleichfalls bringt die geringste Dosis (Ratio 6:1) keine Unterschiede hinsichtlich der Bleiexposition; hier sind auch noch keine Unterschiede zur Kontrolle feststellbar.

Tabelle 6: Mittelwertsvergleiche an Tumorzellen bei allen getesteten Immunzellrationes bleigefütterter und unbelasteter Tiere gegen die Kontrollzellen (= Tumorzellen ohne Immunozyten)

ZELLRATIO[+]	Vergleich mit bleigefütterten Tieren				Vergleich mit unbelasteten Tieren			
	$\bar{x}$ + s	FG: 10	Prüfgröße t	I.W.	$\bar{x}$ ± s	FG: 10	t	I.W.(%)
500:1	29,7 8,9		13,8	0,00	35,7 5,4		14,8	0,00
250:1	46,0 6,4		12,3	0,00	68,3 5,5		6,3	0,01
125:1	49,2 6,0		11,9	0,00	97,8 11,6		0,8	42,11
60:1	56,8 9,9		7,3	0,00	100,2 9,6		1,4	18,44
30:1	70,1 6,1		6,1	0,01	101,3 11,5		1,4	17,13
15:1	83,6 8,7		2,0	6,57	97,8 9,0		0,9	34,70
6:1	95,5 5,3		0,8	46,95	99,3 5,1		1,7	12,45
Kontrolle	92,8 6,7							

[+]Zellratio: Immunzellen/Tumorzellen

Tabelle 7: Mittelwertsvergleiche an Tumorzellen bei allen getesteten Immunzellrationes mit bleigefütterten und bleifreiernährten Tieren

ZELLRATIO	Vergleichswert (bleigefütterte Tiere) $\bar{x} \pm s$	Vergleich mit bleifreiernährten Tieren $\bar{x} \pm s$	FG 10	Prüfgröße t	I.W.
500:1	29,7 8,9	35,7 5,4		1,4	18,72
250:1	46,0 6,4	68,3 5,5		6,4	0,01
125:1	49,2 6,0	97,8 11,6		9,1	0,00
60:1	56,8 9,9	100,2 9,6		7,7	0,00
30:1	70,1 6,1	101,3 11,5		5,8	0,02
15:1	83,6 8,7	97,8 9,0		2,8	1,94
6:1	95,5 5,3	99,3 5,1		1,3	23,44

Experimente sieben Tage nach Immunisierung

Aus den Verläufen der Mittelwertsvergleiche in Tabelle 8 wird ersichtlich, daß unter der Bleibelastung in allen Immunzellrationes die Unterschiede im Tumorzellwachstum auf einem höheren Signifikanzniveau liegen als bei dem Versuchsansatz ohne Bleizugabe; hier sind die Effekte bei den Verhältnissen 125:1 nur schwach signifikant und bei 15:1 nicht signifikant. Vergleichen wir in Tabelle 9 für jede getestete Immunzell-/Tumorzellratio die Mittelwerte für Versuche mit Tieren, die einmal bleifrei und zum anderen mit definiertem Bleizusatz ernährt worden sind, können wir bei Zellrationes von 125:1 und 15:1 hochsignifikante Unterschiede auf einem Signifikanzniveau von 0,01% bestimmen. Die Unterschiede, die durch die Bleizugabe verursacht sind, treten in den mittleren Rationes signifikant hervor, während die Effekte der niedrigsten und höchsten Dosis schwächer vom Ernährungsstatus abhängen.
Wenn wir wie in Tabelle 10 die Unterschiede zwischen Experimenten ohne Immunisierung (d.h. sofortige Milzentnahme) und Versuchen sieben Tage nach Immunisierung untersuchen, können wir feststellen, daß in der bleibelasteten Gruppe die Effekte bei allen getesteten Immunzellverhältnissen gegenüber der nicht bleiexponierten Gruppe deutlicher ausgeprägt sind (Tabelle 10).

Abbildung 2 zeigt die zellvermittelte Immunität im allogenen System. In Säulendiagrammen wird die Reduktion des Tumorzellwachstums nach Inkubation mit Immunzellen aus bleibelasteten und bleifreigehaltenen Mäusen dargestellt, und zwar

für Versuche ohne durchgeführte Immunisierung und Experimenten sieben Tage nach intraperitonealer Immunisierung.

In Abbildung 2 ist das allogene System dargestellt:

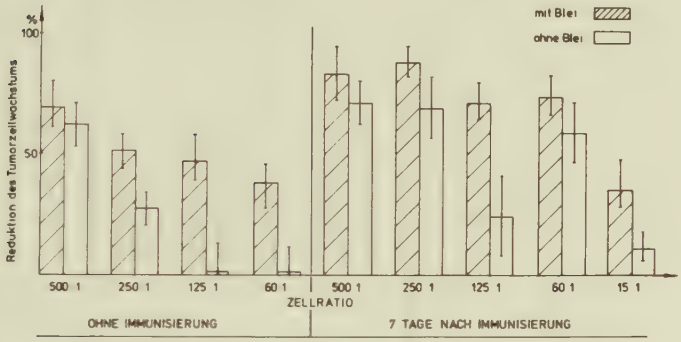


Abbildung 2: Zellvermittelte Immunität im allogenen System. Wachstum der YAC-Tumorzellen nach Inkubation mit Immunzellen aus bleibelasteten und bleifreigefütterten Mäusen des Stammes C57BL/6

Tabelle 8: Mittelwertsvergleiche an Tumorzellen bei allen getesteten Immunzellrationes bleigefütterter Tiere und bleifreiernährter Mäuse gegen die Kontrollzellen

ZELLRATIO	Vergleich mit bleigefütterten Tieren sieben Tage nach Immunisierung				Vergleich mit bleifreiernährten Tieren sieben Tage nach Immun.			
	$\bar{x} \pm s$	FG 10	Prüfgröße t	I.W.	$\bar{x} \pm s$	FG 10	t	I.W.
500:1	15,3	10,3	13,4	0,00	27,6	8,6	9,8	0,00
250:1	10,5	6,1	18,0	0,00	29,6	11,5	8,8	0,00
125:1	26,8	7,5	13,6	0,00	74,3	15,5	2,8	1,96
60:1	24,0	7,4	14,3	0,00	39,7	11,9	7,4	0,00
30:1	38,2	9,1	10,6	0,00	55,3	14,7	4,9	0,06
15:1	61,5	9,5	6,3	0,01	87,2	5,9	1,7	10,85
6:1	84,5	13,2	1,6	11,63	101,0	12,9	0,2	79,86
Kontrolle	96,0	9,9						

Tabelle 9: Mittelwertsvergleiche an Tumorzellen bei allen getesteten Immunzellrationes bleigefütterter gegen bleifreiernährter Tiere sieben Tage nach Immunisierung

ZELLRATIO	Vergleichswert (bleibelastete Tiere) $\bar{x} \pm s$		Vergleich mit bleifreiernährten Tieren $\bar{x} \pm s$	FG 10	Prüfgröße t	I.W.
500:1	15,3	10,3	27,6	8,6	2,2	5,24
250:1	10,5	6,1	29,6	11,5	3,6	0,50
125:1	26,8	7,5	74,3	15,5	6,8	0,01
60:1	24,0	7,4	39,7	11,9	2,7	2,05
30:1	38,2	9,1	55,5	14,7	2,4	3,23
15:1	61,5	9,5	87,2	5,9	5,6	0,03
6:1	84,5	13,2	101,0	12,9	2,2	5,21

Tabelle 10: Mittelwertsvergleiche an Tumorzellen bei allen getesteten Immunzellrationes bleigefütterter und bleifreiernährter Tiere
Untersuchung auf Unterschiede zwischen Experimenten ohne Immunisierung und Durchführung des LMC-Testes sieben Tage nach Immunisierung

ZELLRATIO	Vergleich mit bleiexponierten Tieren						Vergleich mit unbelasteten Tieren					
	OHNE		NACH IMMUNISIERUNG				OHNE		NACH IMMUNISIERUNG			
	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm s$		FG 10 t	I.W.	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm s$		FG 10 t	I.W.
500:1	29,7	8,9	15,3	10,9	2,5	3,06	27,6	8,6	35,7	5,4	1,9	7,97
250:1	46,0	6,4	10,5	6,1	9,8	0,00	68,3	5,5	29,6	11,5	7,4	0,00
125:1	49,2	6,0	26,8	7,5	5,7	0,02	97,8	11,6	74,3	15,5	2,9	1,35
60:1	56,8	9,9	24,0	7,4	6,5	0,01	100,2	9,6	39,7	11,9	9,7	0,00
30:1	70,1	6,1	38,2	9,1	7,2	0,00	100,3	11,5	55,5	14,7	6,0	0,02
15:1	83,6	8,7	61,5	9,5	4,2	0,19	97,8	9,0	87,2	5,9	2,4	3,49
6:1	95,5	5,3	84,5	13,2	1,9	8,84	99,3	5,1	101,0	12,9	0,3	76,63

II. Syngenes System

A. Meßwerte

In nachfolgenden Tabellen (Tabelle 11-16) sind die ausgezählten vitalen LEWIS-Tumorzellen nach Auswertung des LMC-Tests angegeben:

Experimente mit nichtimmunisierten Tieren

Tabelle 11a: Vitale Tumorzellen, die mit Immunozyten aus bleibelasteten Versuchstieren in verschiedenen Verhältnissen inkubiert waren.

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
49	63	70	91	85	83	86	84
31	44	61	90	93	71	97	103
62	57	67	73	69	90	92	97
54	39	83	80	77	88	104	100
59	45	74	93	89	79	91	91
66	45	61	57	99	84	99	88

Tabelle 11 b: Bleifreigefütterte Versuchstiere

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
59	70	79	90	95	98	101	105
64	83	52	93	108	85	108	91
85	76	63	76	91	102	96	93
47	62	45	67	86	97	98	84
68	71	69	82	114	112	100	106
58	65	89	72	93	99	93	107

Experimente nach intraperitonealer Immunsierung der Versuchstiere

Tabelle 12 a: Bleibelastete Versuchstiere
Vitale Tumorzellen nach Inkubation mit Immunzellen. Durchführung des LMC-Tests sieben Tage nach Immunisierung

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
35	53	41	73	89	95	97	110
29	37	33	81	95	99	102	105
24	21	28	67	99	111	90	92
19	40	50	90	119	102	100	118
34	34	38	55	103	97	85	84
27	49	32	29	97	93	89	90

Tabelle 12 b: Bleifreigefütterte Versuchstiere

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
46	52	57	90	95	89	96	103
50	59	43	75	87	100	108	97
31	44	31	87	109	92	100	115
43	37	49	80	81	99	86	90
28	61	55	98	118	107	99	82
50	48	54	89	99	104	104	103

Tabelle 13 a: Bleibelastete Versuchstiere
Vitale Tumorzellen nach Inkubation mit Immunzellen.
Durchführung des LMC-Tests vierzehn Tage nach Immunisierung

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
1	35	54	83	37	93	89	99
0	29	48	91	40	85	94	108
0	18	37	74	49	90	73	112
2	51	52	80	62	79	102	100
0	20	49	77	47	104	99	91
1	12	60	72	33	106	100	103

Tabelle 13 b: Bleifreigefütterte Tiere

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
39	52	68	76	83	97	107	102
27	44	59	91	95	90	93	100
14	36	50	67	101	101	110	98
22	39	47	74	79	75	88	93
20	41	56	80	98	107	109	115
10	22	43	55	89	93	94	91

Tabelle 14 a: Bleibelastete Versuchstiere
Vitale Tumorzellen nach Inkubation mit Immunzellen. Durchführung des LMC-Tests einundzwanzig Tage nach Immunisierung

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
1	3	21	43	70	88	90	97
0	1	14	35	63	71	102	104
0	1	9	28	69	79	77	89
1	0	17	37	82	98	94	93
1	2	13	49	59	67	109	101
0	1	10	25	69	76	98	73

Tabelle 14 b: Bleifreigefütterte Tiere

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
8	28	53	68	71	74	87	90
3	12	41	59	85	87	100	98
1	19	37	72	92	98	78	102
4	8	59	64	82	105	80	86
2	17	43	54	76	87	109	89
9	8	37	56	85	88	97	75

Tabelle 15 a: Bleibelastete Versuchstiere
Vitale Tumorzellen nach Inkubation mit Immunzellen. Durchführung des LMC-Tests achtundzwanzig Tage nach Immunisierung

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
10	35	49	70	82	91	91	90
7	22	57	87	90	95	103	87
14	29	40	90	99	100	97	101
9	40	38	66	78	85	81	72
23	24	44	81	89	83	78	89
18	11	35	89	93	86	84	98

Tabelle 15 b: Bleifreiernährte Tiere

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
43	34	61	77	80	89	94	91
37	21	55	68	74	90	87	98
23	18	49	92	97	101	97	70
49	27	40	80	83	73	99	101
35	39	58	78	99	94	71	82
45	24	69	84	92	85	86	84

Tabelle 16 a: Bleibelastete Versuchstiere
Vitale Tumorzellen nach Inkubation mit Immunzellen. Durchführung des LMC-Tests fünfunddreißig Tage nach Immunisierung

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
0	2	56	80	79	85	97	94
1	0	42	72	88	93	91	87
0	1	48	89	94	79	82	101
2	1	39	92	99	100	112	90
1	0	52	79	102	99	89	102
1	3	48	96	95	109	90	84

Tabelle 16 b: Bleifreigefütterte Tiere

ZELLRATIO (Immunzellen/Tumorzellen)							
500:1	250:1	125:1	60:1	30:1	15:1	6:1	Tumorzellen ohne Immunozyten
1	19	80	91	87	99	90	97
1	10	72	86	94	104	87	81
2	8	65	99	71	85	78	99
0	15	77	104	89	97	100	105
0	21	69	99	85	105	99	78
1	12	69	94	87	87	116	109

B) Globale Analyse des Testsystems

Die Versuchsergebnisse des syngenen Systems wurden statistisch analog zum allogenen System auf drei Einflußgrößen überprüft:

-Immunzellzugabe: 8 Stufen
-Bleizugabe: 2 Stufen
-Untersuchungstag bzw. Entnahmezeitpunkt der Milzen: 6 Stufen (d.h. sofortige Milzentnahme bei Versuchen ohne Immunisierung, Milzentnahme 7, 14, 21, 28 und 35 Tage nach Immunisierung

Wieder untersuchten wir diese Größen und deren Wechselwirkungen auf Signifikanz, auf Rangfolge der Haupteffekte sowie die für die jeweiligen Faktorstufen geschätzten Effekte auf das Gesamtmittel.

Tabelle 17: Varianzanalyse

Varianzursache	Summenquadrate	FG	Prüfgröße F	I.W.
Haupteffekte:				
V1= Immunzellzugabe:	446.522,59	7	719,01	0,00
V2= Bleizugabe	8.781,25	1	98,98	0,00
V3= Untersuchungstag	36.268,25	5	81,76	0,00
2-fache Wechselwirkungen				
V1, V2	3.289,85	7	5,29	0,00
V1, V3	51.614,52	35	16,62	0,00
V2, V3	992,47	5	2,24	0,05
3-fache Wechselwirk.				
V1, V2, V3	12.876,69	35	4,15	0,00

Forsetzung von Tabelle 17:

Varianzursache	Summenquadrate	FG	Prüfgröße F	I.W.
Erklärte Varianz	560.345,61	95	4,15	0,00
Restvarianz	42.584,47	480	66,49	0,00
Gesamtvarianz	602.930,08	575		

Die Wirkung der drei Haupteffekte und deren Wechselwirkungen sind bis auf die Interaktion Bleizugabe und Untersuchungstag bzw. Entnahmezeitpunkt der Milzen signifikant (Tabelle 17).

Tabelle 18: Abschätzung der Effekte für die jeweiligen Faktorstufen auf das Gesamtmittel
mit a) unlogarithmierten Werten
b) logarithmierten Daten

Gesamtmittel: a) 68,11
b) $10^{1,71} = 50,29$

Variable:	Ratio	Geschätzte Effekte auf das Gesamtmittel a)	b)
Immunzellzugabe:	500:1	-45,8	-41,06
	250:1	-37,9	-31,34
	125:1	-17,9	- 4,52
	60:1	7,32	21,15
	30:1	17,06	31,89
	15:1	23,9	39,11
	6:1	26,4	44,21
	Kontrolle	26,9	44,21
	Eta:	0,86	0,74
Bleizugabe:			
1 Ohne Bleizugabe		3,9	8,97
2 Mit Bleizugabe		-3,9	-7,64
	Eta:	0,12	0,14

Fortsetzung von Tabelle 18:

Variable:	Ratio	Geschätzter Effekt auf das Gesamtmittel	
Untersuchungstag:		a)	b)
Stufe 1: Ohne Immunisierung		12,1	26,33
Stufe 2: 7 Tage nach Immun.		5,8	16,32
Stufe 3:14 Tage nach Immun.		- 1,64	- 1,17
Stufe 4:21 Tage nach Immun.		-13,82	-19,67
Stufe 5:28 Tage nach Immun.		- 0,76	7,59
Stufe 6:35 Tage nach Immun.		- 1,73	14,14
	Eta:	0,25	0,30

Nach Analyse der Rangfolge der Effekte hat die Immunzellzugabe (eta: 0,86) den stärksten Einfluß auf die die Meßergebnisse. Der Untersuchungstag zeigt in diesem System einen noch stärkeren Effekt (eta: 0,12). Die Rangfolge bleibt auch bestehen, wenn logarithmierte Werte berücksichtigt werden.
Wenn wir die in Tabelle 18 aufgelisteten Effekte auf Monotonie oder einen systematischen Trend untersuchen, stellen wir ab einer Ratio von 125:1 einen deutlichen Effekt fest; das Verhältnis 30:1 zeigt eine stärkere Wirkung als die Ratio Immunzellen/Tumorzellen von 15:1.
Die Unterschiede, die sich durch die Untersuchungstage ergeben (sofortige Milzentnahme, Milzextirpation 7 bis 35 Tage nach Immunisierung), sind recht uneinheitlich. Sie ergeben einen u-förmigen Trend.
Es zeigt sich ein deutlich ausgeprägter Effekt am 21. Tag nach erfolgter intraperitonealer Immunisierung. Deshalb ist diese Einflußgröße nicht geeignet für die Errechnung der linearen Regression.

C) Einzelvergleiche zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen Faktorkombinationen

Experimente ohne Immunisierung

Die Werte in Tabelle 19 zeigen, daß in dem Versuch mit bleigefütterten Tieren der Unterschied zur Kontrolle (Tumorzellen ohne Immunozyten) gegenüber gleichem Experiment mit bleifreiernährten Mäusen verstärkt wird.
Die bleiexponierten Tiere erreichen bereits bei einem Verhältnis Immunzellen von 15:1 einen nachweisbaren Effekt der Reduktion des Tumorwachstums gegenüber der Kontrolle (Tumorzellen ohne Immunzellen).
Die relativ großen Streuungen bei den nächstwirkenden Rationes 30:1 und 60:1 lassen diesen Effekt nicht mehr statistisch sichern. Ab dem Verhältnis 125:1 sind deutliche Unterschiede zur Kontrolle feststellbar.
Dagegen zeigen bleifreigefütterte Tiere bei den Rationes Immunzellen/Tumorzellen von 6:1, 15:1 und 30:1 keinen Unterschied zur Kontrolle. Ab dem Verhältnis 60:1 lassen sich die Unterschiede statistisch sichern.
Die mittleren Werte der bleiexponierten Tiere liegen auch bei den höheren Dosen zugesetzter Immunozyten niedriger als die der bleifreiernährten Tiere.
Bei dem Vergleich der zytotoxischen Aktivität der Milzimmunzellen kann jedoch zwischen bleibelasteten und nichtexponierten Tieren nur bei Rationes Immunzellen/Tumorzellen von 125:1 und 15:1 eine schwache, aber statistisch noch signifikant erhöhte Zytotoxizität der bleibelasteten Gruppe festgestellt werden (Tabelle 20).

Tabelle 19: Mittelwertsvergleiche an Tumorzellen bei allen getesteten Immunzellrationes bleiexponierter und unbelasteter Tiere gegenüber den Kontrollzellen (= Tumorzellen ohne Immunozyten)

ZELLRATIO	Vergleich mit bleigefütterten Tieren					Vergleich mit unbelasteten Tieren				
	$\bar{x}$	± s	FG 10	Prüfgröße t	I.W.	$\bar{x}$	± s	FG 10	Prüfgröße t	I.W.
500:1	53,5	12,5		6,8	0,01	63,5	12,7		5,3	0,04
250:1	48,8	9,1		9,3	0,00	71,2	7,6		5,3	0,04
125:1	69,3	8,4		5,3	0,04	66,2	16,4		4,1	0,24
60:1	80,7	13,9		2,1	6,52	80,0	10,2		3,1	1,13
30:1	85,3	10,9		1,6	14,21	97,8	10,8		0,1	92,74
15:1	82,5	6,8		2,8	1,94	98,8	8,7		0,2	81,26
6:1	94,8	6,4		0,3	79,36	99,3	5,1		0,4	71,40
Kontrolle	93,8	7,4								

Tabelle 20: Mittelwertsvergleiche an Tumorzellen bei allen getesteten Immunzellrationes mit bleiexponierten und unbelasteten Tieren

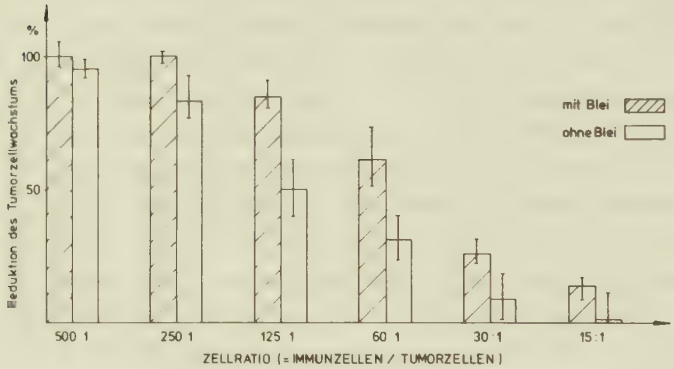
ZELLRATIO	Vergleichswert (bleigefütterte Tiere) $\bar{x} \pm s$		Vergleich mit unbelasteten Tieren $\bar{x} \pm s$		FG 10	Prüfgröße t	I.W.
500:1	53,5	12,5	63,5	12,7		1,4	19,77
250:1	48,8	9,1	71,2	7,6		4,6	0,10
125:1	69,3	8,4	66,2	16,4		0,4	68,42
60:1	80,7	13,7	80,0	10,2		0,1	88,81
30:1	85,3	10,9	97,8	10,8		2,0	7,17
15:1	82,5	6,8	98,8	8,7		3,6	0,47
6:1	94,8	6,4	99,3	5,1		1,3	20,80

Experimente nach Immunisierung (7 - 35 Tage)

Nach Immunisierung zeigen die Immunzellen bleibelasteter Tiere eine stärkere zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen als die der bleifreiernährten Tiere. Diese Unterschiede sind aber nicht bei allen Rationes Immunzellen/Tumorzellen signifikant ausgeprägt. Mit zunehmender Immunisierungszeit werden die Unterschiede zwischen bleiexponierten und bleifreiernährten Tieren im Bereich höherer Dosen verstärkt; jedoch erlauben die in Tabelle 23 dargestellten Resultate keine strenge systematische Charakteristik. So fallen die Ergebnisse des 28. Tages nach Immunisierung sowohl für bleiexponierte als auch für bleifreiernährte Tiere heraus: Für hohe Rationes Immunzellen/Tumorzellen liegen die mittleren Werte noch vergleichsweise hoch.
Bei der statistischen Analyse (Tabelle 21) der Immunantwort auf Unterschiede innerhalb beider Versuchsgruppen zeigt sich nach sieben Tagen bei hoher Zellratio ein signifikanter Effekt. Nach 14 Tagen ist bei dieser Zellratio von 500:1 der Effekt noch stärker ausgeprägt. Ein herausfallendes Resultat ist eine starke Wachstumsreduktion bleiexponierter Tiere nach 14 Tagen bei einem Verhältnis Immunzellen/Tumorzellen von 30:1. Die ausgeprägtesten Unterschiede sind nach 21 Tagen bei Zellrationes von 250:1, 125:1 und 60:1 (Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0{,}1\%$)(Abbildung 3), nach 28 Tagen bei einem Zellverhältnis von 125:1 sowie nach 35 Tagen bei einer Ratio von 125:1 und 60:1 (Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0{,}1\%$) festgestellt worden.

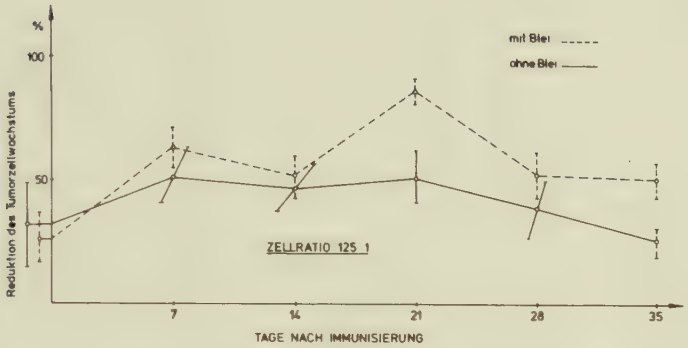
In Abbildung 4 wird versucht, die Entwicklung der zellvermittelten Immunität an allen untersuchten Tagen darzustellen, wobei die Unterschiede zwischen bleibelasteter und unbeeinflußter Versuchsgruppe bei einer Zellratio von 125:1 verdeutlicht werden.

Abbildung 3:



Reduktion des Tumorzellwachstums im syngenen System nach Inkubation mit Immunzellen aus bleigefütterten und bleifreiernährten Mäusen 21 Tage nach intraperitonealer Immunisierung.

Abbildung 4:



Entwicklung der zellvermittelten Immunität im syngenen System 7, 14, 21, 28 und 35 Tage nach intraperitonealer Immunisierung bei einer Zellratio (Immunzellen/Tumorzellen) von 125:1.

Tabelle 23: Mittelwertsvergleiche an Tumorzellen bei allen getesteten Immunzellrationes mit bleiexponierten gegen unbelastete Tiere an allen untersuchten Tagen nach intraperitonealer Immunisierung

a) LMC-Test 7 Tage nach Immunisierung

ZELLRATIO	Vergleichswert (bleigefütterte Tiere) $\bar{x} \pm s$	Vergleich mit unbelasteten Tieren $\bar{x} + s$	FG 10	Prüfgröße t	I.W.
500:1	28 6,1	41,3 9,6		2,9	1,59
250:1	39 11,4	50,2 9,1		1,9	8,77
125:1	37 7,8	48,2 9,8		2,2	5,00
60:1	65,8 21,6	86,5 8,1		2,2	5,13
30:1	100,3 10,3	98,1 13,7		0,3	75,58
15:1	99,5 6,4	98,5 6,9		0,3	78,79
6:1	93,8 6,8	98,5 6,9		1,2	25,49
	b) LMC-Test 14 Tage nach Immunisierung				
500:1	0,7 0,8	22 10,3		5,1	0,05
250:1	27,5 14,1	39 9,9		1,6	13,14
125:1	50 7,7	53,8 9,1		0,8	45,24
60:1	79,5 6,9	73,8 9,1		0,9	34,61
30:1	44,7 10,4	90,8 8,7		8,3	0,00
15:1	92,8 10,5	93,8 10,9		0,2	84,91
6:1	92,8 10,8	100,1 9,6		1,2	24,45

Tabelle 23: c) LMC-Test 21 Tage nach Immunisierung

ZELLRATIO	Vergleichswert (bleigefütterte Tiere) $\bar{x} \pm s$		Vergleich mit unbelasteten Tieren $\bar{x} \pm s$		FG: 10 Prüfgr. t	I.W.
500:1	0,5	0,5	4,5	3,2	4,3	0,00
250:1	1,3	1,0	15,3	7,7	3,2	0,00
125:1	14,0	4,5	45,0	9,0	7,5	0,00
60:1	36,2	8,9	62,2	7,1	5,6	0,03
30:1	68,7	7,8	81,8	7,4	2,9	1,31
15:1	79,8	11,4	89,8	10,6	1,6	14,54
6:1	94,8	10,9	91,8	12,1	0,5	66,45
	d) LMC-Test 28 Tage nach Immunisierung					
500:1	13,5	6,1	38,7	9,2	5,6	0,03
250:1	26,8	10,3	27,2	8,0	0,1	90,67
125:1	43,8	8,1	55,3	10,0	2,2	0,50
60:1	80,5	10,3	79,8	7,9	0,1	86,98
30:1	88,5	7,6	87,5	10,0	0,2	82,81
15:1	90,0	6,6	88,7	9,4	0,3	77,19
6:1	91,0	9,6	89,0	10,3	0,3	73,08
	e) LMC-Test 35 Tage nach Immunisierung					
500:1	0,8	0,7	0,8	0,7	0	100,0
250:1	1,2	1,2	14,1	5,1	6,0	0,01
125:1	47,5	6,2	72,0	5,5	7,2	0,00
60:1	84,7	9,1	95,5	6,5	2,4	3,76
30:1	92,8	8,3	85,5	7,7	1,6	14,13
15:1	94,2	10,8	96,6	8,1	0,4	68,27
6:1	93,5	10,2	95,0	13,1	0,2	81,23

Diskussion

Der Einfluß von Blei auf die Abwehr des Organismus - die Immunantwort - ist in mehreren Arbeiten beschrieben worden.
Die Mehrzahl der Arbeiten zeigte, daß chronische Bleiintoxikation die Immunantwort hemmt - zur Formation niedrigerer Antikörpertiter führt (31, 32).
Andere Autoren beobachteten bei bleiexponierten Tieren einen Anstieg der Antikörperbildung (33, 35) und diskutieren als möglichen Mechanismus eine Adjuvanz dieses Schwermetalls (35). Eine Komplexbildung zwischen Blei und dem Antigen könnte zu einer verbesserten Stimulierung des Immunapparates führen. Die höchsten Antikörpertiter sind nämlich in diesen Experimenten erreicht worden, wenn Blei und Humanserum-Albumin oder Rinder-Gamma-Globulin als Antigen vorher in vitro gemischt und dann den Versuchstieren injiziert worden waren.
In unseren Experimenten haben wir eine höhere Zytotoxizität der Immunzellen gegen Tumorzellen bei bleibelasteten Tieren im Vergleich zu nichtexponierten Mäusen beobachtet.
Diese Ergebnisse stimmen mit den Versuchen von WILLE et al (44) überein, die in vivo nach Bleiexposition bei Mäusen weniger Lungenmetastasen gegenüber Kontrolltieren beobachteten, wenn Tumorzellen intravenös injiziert wurden. Die Unterschiede können zwar dadurch erklärt werden, daß eine Bleiintoxikation den gesamten Organismus selbst beeinflußt, wobei hormonale, metabolische und verschiedene unspezifische Einflüsse diskutiert werden müssen.

Jedoch weisen die vorliegenden in vitro Versuche daraufhin, daß Einflüsse auf das Immunsystem nach Bleiexposition vorhanden sind(22). Die Beobachtung, daß das Wachstum von Tumorzellen in vitro durch Zugabe von Immunzellen aus bleibelasteten Mäusen gehemmt werden kann, deutet auf die Rolle der zellulären Funktionen bei der Tumorabwehr hin.
Die Immunität gegen allogene und syngene Tumoren, soweit sie eine spezifische Immunantwort hervorrufen können, wird in erster Linie durch Immunzellen vermittelt.
Zu den wichtigsten Schutzmechanismen des Tumorwachstums gehören das immunologische "Enhancement" (21, 26) und die Formation der Suppressor-T-Zellen (3,18, 19, 30). Wird die Bildung von "enhancing"-Antikörpern oder "enhancing-Antigen-Antikörperkomplexen" (21, 38) vermieden, kann sich die Abwehr gegen Tumoren verbessern.
Da wir in unseren Versuchen Immunozyten ohne Zugabe von Antiserum verwendeten, ist die Möglichkeit der Einwirkung von Serumkomponenten auf das Tumorwachstum in vitro nicht wahrscheinlich.
Die Interaktion der verschiedenen Immunzellen mit den Tumorzellen wird durch eine zeitabhängige Zellkooperation reguliert. Auch die Resultate unserer Experimente haben gezeigt, daß die zytotoxische Aktivität der Immunzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung unterschiedlich sind.
Eine stärkere Reaktion der Immunzellen gegen syngene und allogene Tumorzellen kann durch bleibedingte Einwirkungen auf Makrophagen, NK (= natural killing)-Zellen sowie T-Zellen beruhen.
In mehreren Arbeiten wurde berichtet, daß

durch Bleibelastung der Versuchstiere die Phagozytoseaktivität der Makrophagen stimuliert werden kann (4, 27, 34, 35). Die Makrophagen kommen in unseren in vitro-Experimenten kaum in Frage, da wir mit unserer Methode Immunozyten aus der Milz isolierten, wo sich Makrophagen nur zu einem geringen Anteil formieren können. Um diese Einflußmöglichkeit zu untersuchen, wäre es notwendig, gereinigte Populationen von Lungenmakrophagen in den LMC-Test einzusetzen.
Kurze Zeit nach der Transformation einer Zelle in eine Tumorzelle sind die NK-Zellen in der Lage, eine Antigenänderung dieser Zellen zu erkennen. Wenn diese Immunzellpopulation durch Blei geschädigt würde, könnte der Tumor weiterwachsen, wogegen bei einer Stimulierung der NK-Zellen durch Blei sich schlechtere Wachstumsbedingungen für den Tumor ergeben würden.
Den T-Zellen kommt die zentrale Rolle bei der Bekämpfung der maligne entarteten Zellen zu. Dabei unterscheiden wir Effektor-T-Zellen, die sich zu einem Klon differenzieren und die Tumorzellen spezifisch schädigen sowie die Helfer-T-Zellen, die die B-Zellen zur Produktion von Antikörpern anregen. Eine Schädigung der T-Zellen durch toxische Bleidosen würde die Wachstumsmöglichkeiten des Tumors auf Grund einer Beeinflussung der Effektor-T-Zellen verbessern. Die verminderte Stimulation der B-Zellen durch Schädigung der Helfer-T-Zellen würde das Wachstum des Tumors nicht unterdrücken können, da dadurch auch die Bildung von "enhancing"-Antikörpern supprimiert würde.

Die Suppressor-T-Zellen bremsen in erster Linie die Aktivität der Effektor-T-Zellen und die Formation von Antikörpern bei B-Zellen. Sie sind sehr viel empfindlicher gegen Bestrahlung oder Cyclophosphamid als andere Immunpopulationen (37) und es wäre vorstellbar, daß auch eine Bleibelastung zu einer selektiven Schädigung der Suppressor-T-Zellen führen könnte. Tiere mit niedrigerem Anteil Suppressor-T-Zellen könnten dann größere Mengen Effektor-T-Zellen mit "killing"-Kapazität entwickeln.
Schließlich muß daran gedacht werden, daß Blei sich vielleicht auch an Tumorassoziierte Transplantationsantigene (TATA) bindet und damit die Immunogenität der Antigene erhöhen könnte. Durch diesen Mechanismus käme es zu einer Stimulation der T-Zellen und zu einer erhöhten Wirkung der Effektor-T-Zellen; aber auch eine vermehrte Produktion von "enhancing-Antikörpern" durch B-Zellen ist möglich.
Eine Erklärung der von WILLE et al (44) und der in dieser Arbeit beschriebenen Befunde über die bleibedingte Stimulation des Immunsystems ist deshalb schwierig, da die Immunreaktionen sehr komplex ablaufen und das Ergebnis des Zusammenwirkens der verschiedenen Komponenten des Immunsystems ist. Hier erscheint das Gleichgewicht zwischen stimulierenden und supprimierenden Bestandteilen bedeutungsvoll.
Änderungen der Immunreaktion können sowohl zur besseren Vernichtung maligne entarteter Zellen führen als auch den Tumor schützen.

Die vorliegende Arbeit ist nur ein Beitrag zur Klärung der Bleiwirkung auf das Immunsystem und tumorimmunologischen Vorgänge.
Weitere Versuche müssen klären, ob bleibelastete Tiere die Fähigkeit besitzen, Antigene besser zu erkennen oder die Formation von "blocking"-Faktoren oder "enhancing"-Faktoren sowie die Zahl und/oder Funktion der Suppressor-T-Zellen hemmen.
Vor allem durch Untersuchungen von Dosis-Wirkung-Beziehungen sollte geklärt werden, bei welchen Bleidosen erste Einflüsse oder Veränderungen am Immunsystem auftreten. Bis dahin müssen diese Befunde sowie die Ergebnisse von WILLE et al mit großer Zurückhaltung diskutiert werden und können nicht auf die Verhältnisse am Arbeitsplatz oder die Bleibelastung der Stadtluft übertragen werden.

Literatur

1. ALEXANDER, R.H. and R.D. HINDSDILL: Effects of Lead on Resistance in Mice to challenge with Salmonella Enteritis.
Abstr.Ann.Meet.Amer.Soc.Microbiol. 75 (1975), 76

2. ALLISON, A.C., BERMAN, L.D., LEVEY, R.H.: Increased tumour induction by adenovirus type 12 in thymectomized mice treated with anti-lymphocyte-serum
Nature(London), 215, 185 (1967)

3. BASTEN, A., J.F.A.P. MILLER, J. SPRENT and C. CHEERS: Cell-to-cell interaction in the immune response.
X: T-cell-independent suppression in tolerant mice
J.exp.Med., 140 (1974), 199

4. BECK, E.G. und N. MANOJLOVIC: Blei.
Lufthygiene und Silikoseforschung, Jahresbericht 5 (1972), 34

5. BINGHAM, E. E.A. PFITZER, W. BARKLEY and E.P. RADFORD: Alveolar macrophages: Reduced number in rats after prolonged inhalation of lead-sesquioxide.
Science, 162 (1968), 1267.

6. BINGHAM, E., W. BARKLEY, W. ZERWAS and E.P. RADFORD: Alveolar macrophages: Responses of alveolar macrophages to metals. Inhalation of lead and nickel. Arch.environm.Hlth, 25 (1972), 406.

7. BORNEFF, J.: Arbeitsmedizin in Vorlesungen Stuttgart: F.K.Schattauer Verlag, 1973

8. EWERS, U., L. WEISSER, A. WEGNER: Einfluß einer chronischen Bleibelastung auf die Infektionsresistenz. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt., Orig. Reihe B, 170 (1980), 387.

9. DEHNEN, W., W. MÖNCH, A. BROCKHAUS: Beeinflussung des Abbaus von Benzo(a)pyren in der Lunge durch Schwermetalle. 6. Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. vom 27. bis 29.9.1976 in Mainz. Vortrag

10. EWERS, U.: Wirkungen von Blei auf das Immunsystem. Lufthygiene und Silikoseforschung, Jahresbericht 10 (1977), 179.

11. EWERS, U.: Persönliche Mitteilung (1979)

12. FENYÖ, E.M., E. KLEIN, G. KLEIN and K. SWIECH: Selection of an immunoresistant Moloney lymphoma subline with decreased concentration of tumorspezific surface antigens. J.Nat.CÄncer Inst., 40 (1968), 69.

13. FENYÖ, E.M.: Characteristics of murine-C-type viruses I.
Int.J.Cancer, 12 (1973), 637.

14. FENYÖ, E.M., K. NAZERIAN and E. KLEIN: Characteristics of murine-C-type viruses II.
Virology, 59 (1974), 574.

15. FENYÖ, E.M., E. YEFENOF, E. KLEIN and G. KLEIN: Immunization of mice with syngenic Moloney lymphoma induces seperate antibodies against virion envelope glycoprotein and virus-induced cell surface antigens.
J.exper.Med., 146 (1977), 1521

16. FURST, A., M. SCHLANDER and D.P. SASMORE: Tumorigenic Activity of lead chromate
Cancer Res., 36 (1976), 1779.

17. GARDNER, D. and F.J. MILLER: Alterations in Bacterial Defense Mechanisms of the Lung induced by Inhalation of Cadmium
Bull.Eur.Physiopathol.Respir., 13 (1977), 157

18. GERSHON, R.K. and K. KONDO: Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes.
Immunology, 18 (1970), 723

19. GERSHON, R.K. and K. KONDO: Infectious immunological tolerance
Immunology, 21 (1971), 723.

20. GORELIK, G., M. FELDMAN and S. SEGAL: Growth of tumor exerting a specific inhibitory effect on progression of lung metastasis. Int.J.Cancer, 21 (1978), 617.

21. HELLSTRÖM, K.E. and I. HELLSTRÖM: Immunological enhancement as studied by cell culture technique. Ann.Rev.Microbiol., 24 (1970), 373.

22. HELLSTRÖM, K.E. and I. HELLSTRÖM: Some aspects of the immune defense against cancer. I. In vitro-studies on animal tumors. Cancer, 28 (1971), 1266.

23. HELLSTRÖM, I. and K.E. HELLSTRÖM: Colony inhibition and cytotoxicity assay. In: In vitro methods in cell-mediated immunity. Eds. B.R. Bloom and P.R. Glade. New York: Academic Press 1971, p. 409.

24. HELLSTRÖM, I., K.E. HELLSTRÖM, G.A. WARNER and H.O. SJÖGREN: Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types. Int.J.Cancer, 7 (1971), 1

25. HEMPHILL, F.E., M.L. KAEBERLE and W.B. BUCK: Lead suppression of mouse resistance to salmonella typhimurium. Science, 172 (1971), 1031.

26. KALISS, N.: Immunological enhancement. Ann.N.Y.Acad.Sci., 129 (1966), 155.

27. KAMINSKI, E.J., C.A. FISCHER, W. KENNEDY and J.C. CALANDRA: Response of pulmonary macrophages to lead.
Brit.J.Cancer, 52 (1974), 1605.

28. a) KERKVLIET, N.I., L.D. KOLLER, L.G. BAECHER and J.A. BRAUNER: Effect of cadmium exposure on primary tumor growth and cell-mediated cytotoxicity in mice bearing MSB sarcomas.
J.Nat.Cancer Inst., 36 (1976), 479.

28. b) KOBAYASHI, N. and T. OKAMOTO: Effects of lead oxide on the induction of lung tumours in syrian hamsters
J.Nat.Cancer Inst. 32 (1974), 1605

29. KOLDOVSKY, P.: Tumor specific transplantation antigens.
In: Recent Results in Cancer Research, Vol. 22. Editor P. Rentschnick.- Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag (1969), p. 38.

30. KOLDOVSKY, P.: Immunologische Aspekte des Tumorwachstums.
Lufthygiene und Silikoseforschung, Jahresbericht 11 (1978), 88

31. KOLLER, L.D.: Immunsuppression produced by lead, cadmium and mercury.
Amer.J.Vet.Res., 34 (1973), 1457.

32. KOLLER, L.D. and S. KOVACIC: Decreased antibody formation in mice exposed to lead. Nature, 250 (1974), 148

33. KOLLER, L.D., J.H. EXON and J.G. ROAN: Humoral antibody response in mice after single dose exposure to lead or cadmium. Proc.Soc.Exper.Biol.Med., 151 (1976), 339

34. KOLLER, L.D. and J.G. ROAN: Effects of lead and cadmium on mouse peritoneal macrophages. J.Reticuloendoth.Soc., 21 (1977), 7.

35. SCHLIPKÖTER, H.-W., L. GHELERTER und M. SONDERFELD: Der Einfluß von Blei auf die Antikörperbildung. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt., Orig., Reihe B, 163 (1976), 417.

36. SCHLIPKÖTER, H.-W. und L. FRIELER: Der Einfluß von Blei bei kurzzeitiger Bleiexposition auf die Bakterienclearance der Lunge. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt., Orig., Reihe B, 168 (1979), 256.

37. SCHWARTZ, A., P.B. ASKENASE and R.K. GERSHON: Regulation of delayed hypersensitivity reaction by cyclophosphamide-sensitive T-cells. J.Immunol., 121 (1978), 1573.

38. SJÖGREN, H.O., I. HELLSTRÖM, S.C. BANSAL and HELLSTRÖM: Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumor bearing individuals may be antigen-antibody complexes Proc.Nat.Acad.Sci., 68 (1971), 1372.

39. STONER, G.D.: Test of carcinogenicity of metallic compounds by pulmonary tumor response in strain A-mice. Cancer Res., 36 (1976), 1744.

40. TAGASUGI, M. and E. KLEIN: A microassay for cell-mediated immunity. Transplantation, 9 (1970), 219.

41. THIND, I.S., S. NARAYANI, K. YUSUH and M. McKENZIE: Lead poisoning and dimished resistance to experimental viral infection. Immunology, 42 (1977), 960.

42. TREJO, R.A.: Reticuloendothelial and hepatic functional alterations following lead acetate administration. Exp.molec.Pathol., 17 (1972), 145.

43. VALENTIN, H., G. LEHNERT und H. PETRY: Arbeitsmedizin, Bd. 2: Berufskrankheiten.- Stuttgart: Gustav Thieme Verl., 1979

44. WILLE, G. et al.: Der Einfluß von Blei auf die zellvermittelte Immunität gegen Tumoren.
(In Vorbereitung)

LEBENSLAUF

Am 30.5.1954 wurde ich in Laage, Kreis Güstrow/ Mecklenburg geboren.
Im August 1955 flüchteten meine Eltern mit meinem Bruder und mir nach West-Berlin; im September 1955 kamen wir in die Bundesrepublik Deutschland nach Massen, im Februar 1956 nach Hilden.

Von April 1960 bis März 1965 besuchte ich die Evangelische Volksschule in Hilden bis zur 5. Klasse, ab April 1965 die Wilhelm-Fabry-Realschule in Hilden. Im Juni 1965 verstarb mein Vater nach schwerer Krankheit im Alter von 50 Jahren.

1970 erwarb ich einen guten Realschulabschluß.

Von 1970 bis 1973 besuchte ich das Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium in Hilden und erreichte das Abitur.
Zum Wintersemester 1973 konnte ich mich an der RWTH Aachen immatrikulieren.

Meine medizinische Ausbildung setzte ich zum Sommersemester 1975 an der Universität Düsseldorf fort.
Am 7.5.1981 bestand ich die Ärztliche Prüfung und erhielt zum 1.6.1981 die Approbation.

Seit dem 1.7.1981 bin ich Assistenzarzt der 2.Medizinischen Klinik an den Städtischen Krankenanstalten Solingen unter Herrn Chefarzt Prof.Dr.med. U. Kanzow.